

INDUCTION OF IMMUNOLOGICAL RESISTANCE

Publication number: JP53121943
Publication date: 1978-10-24
Inventor: DEBITSUDO HAABEI KATSUTSU
Applicant: KATZ DAVID HARVEY
Classification:
- international: **A61K39/00; A61K39/35; A61K39/36; A61K38/11;**
A61K39/00; A61K39/35; A61K38/10; (IPC1-7):
A61K37/02
- european: A61K39/00D4; A61K39/35; A61K39/36
Application number: JP19780011053 19780202
Priority number(s): US19770764586 19770203

Also published as:

 US4191668 (A1)
 NL7801220 (A)
 GB1599454 (A)
 FR2379287 (A1)
 DE2804457 (A1)

more >>

Report a data error here

Abstract not available for JP53121943

Abstract of corresponding document: **US4191668**

Immunosuppressive agents which are conjugates of an antigen linked to a D-glutamic acid:D-lysine copolymer are disclosed. Also disclosed are methods of preparing the conjugates and therapeutic methods for inducing immunological tolerance to antigens.

Data supplied from the **esp@cenet** database - Worldwide

公開特許公報

昭53—121943

⑤Int. Cl.²
A 61 K 37/02

識別記号
A B C
A B F

⑤日本分類
30 G 196
30 H 211
30 H 23

庁内整理番号
6617—44
5727—44
5727—44

④公開 昭和53年(1978)10月24日

発明の数 3
審査請求 有

(全 15 頁)

④免疫学的耐性の誘発

州92037ラジヨラ・ラジヨララ
ンチヨロード(番地なし)

②特 願 昭53—11053

②出 願 人 デビッド・ハーベイ・カツツ

②出 願 昭53(1978)2月2日

アメリカ合衆国カリフォルニア

優先権主張 ③1977年2月3日③アメリカ国
(US)③764586

州92037ラジヨラ・ラジヨララ
ンチヨロード(番地なし)

②発 明 者 デビッド・ハーベイ・カツツ
アメリカ合衆国カリフォルニア

②代 理 人 弁理士 小田島平吉

明 細 書

1 発明の名称

免疫学的耐性の誘発

2 特許請求の範囲

1 D-グルタミン酸；D-リジン共重合体と
抗原との複合体を含有して成る、抗体反応の抑制
により抗原に対する特異的免疫学的耐性を誘発さ
せることができる治療学的免疫抑制剤。

2 該抗原がアレルゲン又は自己抗原である特
許請求の範囲第1項記載の免疫抑制剤。

3 該抗原がベンジルペニシロイル、インシュ
リン、オパールミン、ラクトアルブミン、ベルム
ダー草花粉、アモシー草花粉、果樹園草花粉、及
び草花粉の組合せ、サワギク花粉、サワギク抗原
E、樟の木花粉、蜂毒液、馬尿、猫上皮、ハッ
ドドックハウスダストダニ、クリサンテムムロイ
カンテムム、アルテルナリアテヌイス、トリブシ

ン、キモトリブシン、ドライロッド、パン酵母、
破傷風トキソイド、ジフテリア毒素、フィテン及
びその誘導体から成る群より選ばれたアレルゲン
である特許請求の範囲第2項記載の免疫抑制剤。

4 該抗原がインシュリン、炭酸、オリゴデオ
キシヌクレオチド、チログロブリン、甲状腺細胞
表面又は細胞質、頭頂細胞、副腎細胞、表面細胞、
葡萄膜細胞、基礎膜細胞、赤色細胞表面、血小板
細胞表面、筋肉細胞、胸腺筋様細胞、ミトコンドリ
ア、分泌管細胞、デオキシリボ核糖タンパク質、
アセチルコリン受容体物質、及びその誘導体から
成る群より選ばれた自己抗原である特許請求の範
囲第2項記載の免疫抑制剤。

5 該共重合体が約84000～64000の
分子量及び約60：40のグルタミン酸：リジン
モル比を有する特許請求の範囲第1項記載の免疫
抑制剤。

6. 該抗原がベンジルベニシロイル又はその誘導体である特許請求の範囲第8項記載の免疫抑制剤。

7. 形成された該複合体が少なくとも40:8のベンジルベニシロイル又はその誘導体対共重合体のモル比を有する特許請求の範囲第6項記載の免疫抑制剤。

8. 該抗原がインシュリンである特許請求の範囲第8項記載の免疫抑制剤。

9. 該抗原がサワギク抗原Eである特許請求の範囲第8項記載の免疫抑制剤。

10. 抗原に対して特異的な免疫学的耐性を誘発する治療を必要としている個体において抗原に対する特異的な免疫学的耐性を誘発する治療学的方法において、有効な免疫学的耐性形成量のD-グルタミン酸:D-リジン共重合体と該抗原との複合体を該個体に投与することを特徴とする方法。

- 8 -

びその誘導体から成る群より選ばれたアレルゲンである特許請求の範囲第11項記載の方法。

13. 該抗原がインシュリン、核酸、オリゴデオキシヌクレオチド、チログロブリン、甲状腺細胞表面又は細胞質、頭頂細胞、副腎細胞、表面細胞、葡萄膜細胞、基健膜細胞、赤色細胞表面、血小板細胞表面、筋肉細胞、胸腺筋様細胞、ミトコンドリア、分泌管細胞、デオキシリボ核酸タンパク質、アセチルコリン受容体物質、及びその誘導体から成る群より選ばれた自己抗原である特許請求の範囲第11項記載の方法。

14. 該共重合体が約84,000~64,000の分子量及び約60:40のグルタミン酸:リジンモル比を有する特許請求の範囲第10項記載の方法。

15. 該抗原がベンジルベニシロイル及びその誘導体である特許請求の範囲第12項記載の方法。

11. 抗原に対して特異的な免疫学的耐性を誘発する治療を必要としている個体において抗原に対する特異的な免疫学的耐性を誘発する治療学的方法において、有効な免疫学的耐性形成量のD-グルタミン酸:D-リジン共重合体と該抗原との複合体を該個体に投与することから成り、その際該抗原がアレルゲン又は自己抗原であることを特徴とする方法。

12. 該抗原がベンジルベニシロイル、インシュリン、オバルブミン、ラクトアルブミン、ベルムダー草花粉、アモシー草花粉、果樹園草花粉、及び草花粉の組合せ、サワギク花粉、サワギク抗原E、樺の木花粉、蜂毒液、蛇毒液、馬蹄屑、猫上皮、ハッドドックハウスダストダニ、クリサンテムムロイカンテムム、アルテルナリアテヌイス、トリブシン、キモトリブシン、ドライロット、パン酵母、破傷風トキソイド、ジフテリア毒素、フィチン及

- 4 -

16. ベンジルベニシロイル又はその誘導体対共重合体のモル比が少なくとも40:1である特許請求の範囲第15項記載の方法。

17. D-グルタミン酸:D-リジン共重合体とアレルゲン又は自己抗原である抗原と複合体を含有して成る治療学的免疫抑制剤を製造する方法において、約84,000~64,000の平均分子量及びグルタミン酸:リジンのモル比約60:40を有するD-グルタミン酸:D-リジン共重合体を抗原と反応させる工程を含むことを特徴とする方法。

18. 該反応混合物を約10-12のpHに維持する特許請求の範囲第17項記載の方法。

19. 該抗原がベンジルベニシロイル、インシュリン、オバルブミン、ラクトアルブミン、ベルムダー草花粉、アモシー草花粉、果樹園草花粉、及び草花粉の組合せ、サワギク花粉、サワギク抗

原 E 、樺の木花粉、蜂毒液、蛇毒液、馬歯屑、肺上皮、ハッドドックハウスダストダニ、クリサンテムムロイカンテムム、アルテルナリアテヌイス、トリブシン、キモトリブシン、ドライロット、パン酵母、破傷風トキソイド、ジフテリア毒素、フイテン及びその誘導体から成る群より選ばれたアレルギーである特許請求の範囲第17項記載の方法。

20. 該抗原がインシュリン、核酸、オリゴデオキシヌクレオチド、チログロブリン、甲状腺細胞表面又は細胞質、頭頂細胞、副腎細胞、表面細胞、葡萄膜細胞、基底膜細胞、赤色細胞表面、小腸細胞表面、筋肉細胞、胸線筋様細胞、ミトコンドリア、分泌管細胞、デオキシリボ核酸タンパク質、アセチルコリン受容体物質、及びその誘導体から成る群より選ばれた自己抗原である特許請求の範囲第17項記載の方法。

- 7 -

3 【発明の詳細な説明】

Dグルタミン酸：リジン共重合体に結合した抗原の複合体 (conjugates) である免疫抑制剤 (immunosuppressive agents) が開示されている。この複合体の製造方法及び抗原に対する免疫学的耐性を誘発する治療学的方法もまた開示されている。

本発明は抗原に対する個体の免疫学的耐性 (immunological tolerance) を誘発するのに好適な複合体に関する。この複合体は特異的抗原に対する抗体の産生を抑制することにより機能する。抗原とは、個体中に導入されるとその個体による抗体の産生を引き起こしそしてこれらの抗体と特異的に反応する巨大分子であると定義される。

免疫系統を含んで成る器管、細胞及び分子の基礎的機能は異物 (foreign substances) を認知しそしてそれを体から除去することである。これら

21. 該アレルギーがベンジルペニシロイル又はその誘導体である特許請求の範囲第19項記載の方法。

22. 形成された複合体が、少なくとも40:1であるベンジルペニシロイル又はその誘導体対共重合体のモル比を有する特許請求の範囲第21項記載の方法。

23. 該抗原がインシュリンである特許請求の範囲第19項記載の方法。

24. 該抗原がサワギク抗原 E である特許請求の範囲第19項記載の方法。



- 8 -

の異物は、この異物と該異物に反応して産生される抗体との間の反応により除去される。一般に、この機能は効果的に且つ宿主を害することなく達成される。しかしながら、或る場合においては、たとえば制御されない反応 (アレルギー疾患) 又は異常反応 (自己免疫疾患 (autoimmune disease)) の如き病原性疾患をもたらす得る障害が起こることがある。これらの両疾患の発病学は環境的抗原 (allergens) 又は自己抗原 (self-antigens) に対する抗体の産生に直接又は間接に関係している。更に、免疫系統の機能は異物を認知し且つ除去することであるので、遺伝的に同一でない (即ち allogenic) 受容体個体へ供与体から健康な組織及び器官を移植することはアログラフト (allograft) 反応の故に達成することが困難である。

個体は抗原との接触 (及びそれに対する抗体の

產生)の結果として変化した状態 (*altered state*)を経験するならば、その抗原又は構造的に同様な物質とのその後における接触は病理学的反応を誘発する。かかる個体は1種又はそれより多くの特異的反應誘発性 (*reaction-provoking*)抗原に対して過敏性 (*hypersensitive*)であると言われる。これらの個体が適当な抗原を吸入又は摂取するとき、顕著な且つ共通の発現には枯草熱 (*hay fever*)、喘息 (*asthma*)又は蕁麻疹 (*hives*)が含まれる。この形態のアレルギー ("*atopy*")を発現させる傾向は遺伝性である (*hereditable*)。

抗原に対する個体の最初の抗体反応は後における暴露により誘発される反応よりは小さいそしていくらか異なつた抗体反応を誘発する。抗原に対する最初の暴露は第一次 (*primary*)反応を誘発する。第一次反応における抗体水準がもはや検出され得ない点まで下がつた後同じ抗原とのその後

- 11 -

接触は *IgE* 抗体の架橋を誘発することができる。この架橋は化学的中介体を放出する乳腺及び好塩基体の脱顆粒化を引き起こしそして先に述べたアレルギー反応の発現を生ぜしめる。

アトピーの発現は細胞に結合した (*IgE*) 抗体の產生に依存しているが、免疫系統にとつて重要な他の種類の抗体は *IgG* 種である。これらの *IgG* 抗体は循環抗体 (*circulating antibody*) 又はブロッキング抗体 (*blocking antibody*) と言われる。*IgG* 抗体は抗原と組合わせることもできる。この組合せは、抗原が細胞に結合した *IgE* と反応する能力をブロッキングし、次いで *IgE* 抗体を架橋することによつて抗原を不活性化させることができる。

アレルギー疾患を治療する普通の方法は、少量の増加していく量の抗原を間欠的に、たとえば1週間毎に、且つ乳腺細胞又は好塩基体の脱顆粒化

特開昭53-121943(4)
おける遠避は通常高められた第二次〔既往症の (*anamnesic*)〕反応を誘発する。

このアトピーの発現は個体内におけるレアギン (*reagin*) と呼ばれる或る種の組織感受性 *IgE* 抗体の產生により関与される。これらの *IgE* 抗体は種々の体組織中に存在する細胞項の受容体 (*receptors*) に対する高い親和力を有する。この受容体は体全体にわたる結合組織中の毛管と密接に関連して見出される乳腺細胞 (*mast cells*) 上及び好塩基性白血球 (*basophilic leukocytes*) (*blood cells*) 上にある。乳腺細胞及び好塩基体 (*basophils*) は、高含量の薬理学的活性中介体 (*mediators*)、たとえば細胞質顆粒 (*cytoplasmic granules*) 中に濃縮されたヒスタミン、セロトニン、(5-ヒドロキシトリプタミン) 及びキニン (塩基性ペプチド) を含有する。乳腺細胞及び好塩基体に固定されている *IgE* 抗体の抗原との

- 12 -

の誘発を回避する投与量で、繰り返し注入することによつて個体を免疫する〔脱感作する (*desensitizing*)〕ことから成る。繰り返し注入はブロッキング *IgG* 抗体の水準を増加させるが細胞に結合した *IgE* 抗体の水準を増加させないと考えられている。

この脱感作方法は多くの欠点を伴なり。一貫して治療学的利益を達成することは困難でありそして治療は面倒くさい。更に、環境的抗原にさらすことは *IgE* 抗体のその後の產生を引き起こし、*IgE* 抗原反応及びその後の *IgE* 架橋の可能性は常に存在する。

自己免疫疾患は、個体が自己抗原に対する抗体の產生により免疫学的に反応する自己免疫反応から生じる病理学的状態である。自己免疫性は体の殆んどすべての部分に影響することができ、そして一般に自己抗原と *IgG* 抗体間の反応を含む。

代表的自己免疫疾患は甲状腺、胃粘膜、副腎、皮膚、赤血球及び滑膜 (*synovial membranes*) を包含することができる。

或る種の自己免疫疾患に対しては、非特異性の免疫抑制治療、たとえば全体 X 線照射、又は細胞毒性 (*cytotoxic*) 薬剤の投与が使用されて限られてはいるが好結果を得ている。かかる治療の欠点には使用される薬剤の毒性及びかかる治療の後に続く種々のガン特にリンパ腫 (*lymphomas*) 及び細網細胞肉腫 (*reticulum cell sarcoma*) の増加した出現率が包含される。更に、慢性の免疫抑制に対する非特異性の試薬の使用は、通常的环境下では問題を引き起こさない環境的菌類 (*fungi*)、バクテリア及びウイルスからの重症の感染に対する患者の感受性を大きく増加させる。本明細書に開示された発明は特異的であり且つ不快な (*offending*) 抗原に対する抗体反応を抑制するにすぎ

- 15 -

する第二次反応はそれが同じ担体上に投与される時に誘発され得るにすぎず、もしそれが免疫学的に無関係の担体上に導入されるならば個体はハブテンに対する免疫学的記憶を何ら示さず、そして典型的な第一次反応を与える。

第二次反応に対する能力が多年にわたって持続し得る故に、それは長期に持続する免疫を与えることができる。第一次反応は抗体がよりゆつくりと現われる故に防御性が小さい (*less protective*)。一連の報告書において、本発明者及びその共同研究者の一人は、適当なハブテンが結合した D-グルタミン酸：D-リジンを使用して、長期のハブテン特異性骨髓由来の細胞耐性の系統を証明しそして特徴づけた。

[*J. Exp. Med.*, Vol. 184, pp. 201 - 228 (1971); Vol. 186, pp. 1404 - 1429 及び pp. 426 - 488 (1972);

- 17 -

ない。

抗原抽出物による環境的アレルギーの治療のプロッキング脱感作方法及び自己免疫疾患の非特異性免疫抑制と対照的に、本発明は特異的抗原に対する抗体の産生の抑制による特異的免疫学的耐性の長期持続状態を誘起する手段を提供する。

免疫学の分野における従来技術の観点から、抗原とハブテン間の区別を認識することは重要である。既に定議した如く、抗原は抗体の産生を引き起こしそして産生した抗体と特異的に反応する。対照的にハブテンはそれ自体抗体産生を刺激しないが一旦産生された抗体と結合する小分子として定議される。更に一般に細胞免疫 (*cellular immunity*) を誘発せず、他のハブテンに対する担体として働かずそして免疫原性担体上に導入された時のみ抗体産生を誘発する。抗-ハブテン抗体反応は厳密な担体特異性を有する。ハブテンに対

- 16 -

Vol. 188, pp. 812 - 817 (1978); Vol. 189, pp. 1446 - 1468 (1974) 及び *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* Vol. 71, pp. 8111 - 8114 参照]。

これらの研究は、2, 4 ジニトロフェニル (*Dnp*) ハブテンに対して特異的である抗体種の抗体産生細胞の骨髓由来のリンパ球先駆体における耐性の誘発に成功したことを示した。この研究は *Dnp* と D-グルタミン酸：D-リジン (以後 D-G L と称する) の複合体 (*conjugate*) の使用を含む。

本発明者と共同研究者の一人による最近の研究はヌクレオシドデターミナント (*nucleoside determinants*) に対する耐性はヌクレオシドと D-G L との複合体を使用することによつて得られ得ることを証明した [*J. Immunol.*, Vol. 114, pp. 872 - 876 (1975) 参照]。ヌクレオシドの研究は、複素環式塩基及び 5 炭糖

- 18 -

から構成されているヌクレオシドの混合物に対する耐性の誘発を取り扱った。この研究は *DNP-D-GL* に対する耐性の誘発に類似している。

これらの免疫学的研究は、*D-GL* 共重合体の如き適当な非免疫性担体にカップルした時に単一決定子として機能する化学成分に対する抗体反応の抑制を証明する点で利益があるが、抗原に対する免疫治療学的適用は開示されていない。

ペニシリンアレルギー及び主要な抗原性決定子 (antigenic determinant)、[ベンジルペニシロイル (*BPO*)] の使用に関するところでの実験的結果は *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, Vol. 78, 版 6, pp. 2091 ~ 2095 (1976) に開示されている。

本発明の主題事項は、

(a) 個体中での特異的抗体産生を抑制することが出来る治療学的免疫抑制剤を包含する。該免疫

- 19 -

ドライロツト (*dry rot*)、パン酵母、破傷風トキソイド (*tetanus toxoid*)、ジフテリア毒素 (*diphtheria toxin*)、フィチン (*ficin*) 及びその誘導体が包含される。自己抗原には、核酸、オリゴデオキシヌクレオチド、チログロブリン、甲状腺細胞表面 (*thyroid cell surface*) 又は細胞質 (*cytoplasm*)、頭頂細胞 (*parietal cell*)、副腎細胞 (*adrenal cell*)、表面細胞 (*epidermal cell*)、葡萄膜細胞 (*uvea cell*)、基礎膜細胞 (*basement membrane cell*)、赤色細胞表面 (*red cell surface*)、血小板細胞表面 (*platelet cell surface*)、筋肉細胞、胸腺筋様部細胞 (*thymus myoid cell*)、ミトコンドリア、分泌管細胞 (*secretory duct cell*)、デオキシリボ核酸タンパク質、アセチルコリン受容体物質 (*acetylcholine receptor substance*)、インシュリン及び他の正常ホルモン及び組織因子が包含される。

特開昭53-121943(6)

抑制剤は、*D-グルタミン酸*：*D-リジン* 共重合

体と抗原との複合体である。この抗原はアレルギー (*allergen*) 又は自己抗原 (*self-antigen*) の何れであつてもよい。アレルギーには、ベンジルペニシロイル、インシュリン、オвалブミン (*ovalbumin*)、ラクトアルブミン、ベルムダー草花粉 (*bermuda grass pollen*)、アモシー草 (*timothy grass*) 花粉、果樹園草 (*orchard grass*) 花粉及び草花粉 (*grass pollen*) の組合せ、サワギク (*ragweed*) 花粉、サワギク抗原 *E*、樺の木 (*birch*) 花粉、蜂毒液 (*bee venom*)、蛇毒液 (*snake venom*)、馬の鱗屑 (*horse dander*)、猫上皮 (*cat epithelial*)、ハツドツク (*haddock*)、ハウスダストダニ (*house dust mite*)、クリサンテムムロイカンテムム (*chrysanthemum Leucanthemum*)、アルテルナリアテヌイス (*Alternaria tenuis*)、トリブシン、キモトリブシン、

- 20 -

(b) *D-グルタミン酸*：*D-リジン* 共重合体を抗原と反応させることによつて治療学的免疫抑制剤を製造する方法。カップリングした抗原-*D-GL* 複合体は常用の精製技術によつて回収される。及び

(c) 前記した抗原と *D-グルタミン酸*：*D-リジン* との複合体の投与による、抗原に対する免疫学的耐性誘発治療を必要としている、個体における抗原に対する免疫学的耐性を誘発する治療学的方法。



本発明は特異的に不快な抗原に対する免疫学的耐性の誘発に關する。この抗原はD-G L共重合体にカップリングしている。達成された免疫学的耐性は、個体が、個体への抗原の導入に应答して抗体を産生しないような特異的非反応性状態と定縁することができる。誘発される耐性は、

- (1) 抗原-D-G Lで処理された個体が一次の抗原-特異性抗体反応を発現させることができないこと。
- (2) 抗原-D-G L複合体の、進行する抗-抗原抗体反応 (*anti-antigen antibody response*) を阻害する能力；及び
- (3) 抗原によつて先にプライムされた (*prim-ed*) 個体が、抗原-D-G L複合体による処理に就いて第二次抗-抗原反応 (*anti-antigen response*) を引き起こすことができないこと

- 28 -

するための投与形態は製薬科学において認知された方法により製造することができる。

ペニシリンの如き医薬品に対する過敏症反応 (*Hypersensitivity reactions*) 人間において良く知られているアレルギー疾患である。ペニシリンに關して説明されている関与する機構は一般にアレルギーに対するモデルと考えることができる。特異的抗原-抗体反応の抑制の完全な研究を行なうために、ペニシリンモデルのアレルギーが使用された。

ペニシリンは比較的不安定であり、そしてその溶液の大部分はペニシロイル並びにタンパク質のアミノ基及びスルフヒドラル基の他の置換基を形成する高度に反応性誘導体である、少なくとも少量のペニシレートを含む。最も広範囲に使用されたペニシリンである結晶性カリウムベンジルペニシリンG (KPG) から誘導されたペニ

- 25 -

特開昭53-121943(7)

によつて発現せしめられる。

この抑制は特異的抗体反応に対する有効な抑制作用を有する或る量の抗原-D-G L複合体をその個体に投与することによつて達成される。この明細書において使用された用語「個体」とは、人間又は人間に対するモデルである実験動物を意味する。本発明の複合体の使用に対する医学的指示は、個体内での特異的抗原に対する抗体反応を抑制することが所望される何れかの条件である。用語「抗体反応の抑制」又はその用語の均等ないかなる用語も、特異的抗原に対する免疫学的耐性の意義ある程の増加を意味する。この抑制は個体に抗体反応を抑制又は減少せしめる投与量又は一連の投与量を投与することにより達成される。その量は個体により又は指示によつて変わるけれども、余計な実験を行なうことなく医師によつて容易に決定される。皮下投与が好ましい。複合体を投与

- 24 -

シリンGはカルボキシル基に結合したベンジル基を有し、ペニシリンGの主要な抗原決定素、即ち抗体-抗原反応の特異性を決定する抗原分子の限られた部分はベンジルペニシロイル (以後BPOと称する) である。

本発明の抗原D-G L複合体を製造する方法は、D-G L共重合体をアルカリ溶液中に溶解しそしてこのアルカリ溶液を約2~8モル当量の抗原と反応させることを含む。反応混合物を約10℃乃至80℃の温度で約1時間保持する。反応混合物のpHはアルカリ物質、たとえばKOH又はNaOHの添加により約10-12の範囲に保持する。抗原複合体を公知技術、たとえば透析により洗浄し精製する。それぞれ約84,000、約50,000及び約64,000の分子量並びにグルタミン酸；リジンのモル比60:40を有する適当な共重合体がマイルズラポラトリーズ (Miles

- 26 -

Laboratories), Inc., 1127
Myrtle Street, Elkhart, Indiana,
46514 から入手できる。

本発明の複合体の免疫特異性特徴を決定するため、抗原に対する高力価の IgE 、 IgG 、及び IgM 抗体反応が抗原キーホールアオガイ (*keyhole limpet*) ヘモシアニン (KLH) の腹腔内 (*i. p.*) 注入によつてマウス中に誘発された。次いで反応において産生された抗体の量は以後に記載したアッセイ法により測定された。第一次免疫の前又は後に本発明に従う抗原 - $D - GL$ によるかかるマウスの処理は液索性 (*humoral*) 及び細胞水集の両方で測定した IgE 及び IgG 種のその後の抗 - 抗原抗体反応の顕著な抑制をもたらす。

I BPO - 担体複合体

(a) BPO - KLH 及び BPO - BSA

- 27 -

$BPO_4 - BSA$ ($\Sigma - NH_2$ に当量のカリウムベンジルペニシリン 10 当量) ;

$BPO_{10} - KLH$ ($\Sigma - NH_2$ に当量のカリウムベンジルペニシリン 10 当量 ; $50 \Sigma - NH_2$ 基で評価して 100,000 の KLH のサブユニットの分子量)

(b) $BPO - SRBC$ [ヒツジ赤血球 (*Sheep Erythrocytes*)] 血清 BPO - 特異的 IgG 抗体を試験するのに使用するため、 BPO を *J. Immunol.* 96, pp. 707 - 718 (1966) に記載の方法によつて $SRBC$ にカップリングした。

前記の如くして製造した BPO - 担体はマウスの免疫又は以後に詳細に述べる抗 - BPO 抗体の測定に際し使用した。

II 免疫化手順

マウスを 0.5 ml 無菌塩溶液 (*sterile*

特開昭53-121943(8)
 BPO を *J. Clin. Invest.* 47, pp.

556 - 567 (1968) 及び *Int. Arch. Allergy*, 88, pp. 156 - 171

(1970) に記載されたキーホールアオガイヘモシアニン (KLH) 及びウシ血清アルブミン (BSA) にカップリングさせた。複合体の蛋白質濃度はキエルダール法窒素分析 (BPO 基により寄与された窒素の量に対する補正を伴つて) により決定された。複合体はペナマルデート

(*penamaldate*) 濃度を決定することにより BPO 含有率をアッセイされた。ペナマルデート測定は $BPO - D - GL$ 複合体の分光光度法による定量的決定を含む。[*Methods in Immunology and Immunochemistry*, Academic Press, pp. 141 - 142 (1967) 参照]。得られた BPO / KLH 及び BPO / BSA のモル比は

- 28 -

saline) の容量中の $Al(OH)_3$ 、グル[みょうばん] 4 mg 上に吸着された $BPO - KLH$ 1 μg の腹腔内 (*i. p.*) 注入により免疫した。第一次注入後 2 ~ 4 週間目に強化注入 (*Booster injections*) が腹腔内に与えられた。みょうばん 2 mg と混合した 1 μg $BPO - KLH$ により強化注入を行なつた。

第一次及び第二次免疫の後いろいろな間隔でマウスを後方眼窩叢 (*retro-orbital plexus*) から出血させそして血清抗体水準を下記に示した如く決定した。

III 抗 - BPO 抗体の測定

血清 IgE 抗体

受動皮膚アナフィラキシス (PCA)

PCA 法は所定群のマウスから血清をブールしそして該血清を 2% 正常ラット血清中で逐次に希釈する (2 倍) ことを含む。種々の希釈率の各々

の0.1 M分量を試験ラットの毛をそつた背側皮膚 (dorsal skin) に皮内に注入した。4 - 24時間の感作期間の後、この方法によつてIgE抗体のみを測定するPCA反応を、リン酸塩緩衝食塩水中に溶解した1.0%のエバンス青染料 (Evans' blue dye) 中のBPO-BSS±の静脈内注入 (毛をそつたラット体重250gにつき1cc) により誘発せしめた。PCA力価は5mm直径ブルーイング反応を生ぜしめる血清のもつとも高い希釈率の逆数として表わされる。

[Life Science, 81, pp. 818 - 820 (1969) 参照]

血清抗-KLH抗体の測定

血清IgE抗-KLH抗体水準は前記したPCA反応により決定された。IgG抗-KLH抗体はJ. Immunol., 114, pp. 872-876 (1975) 中に記載の¹²⁵I-標識された単量体

- 81 -

E) を含有する0.1 M炭酸水素ナトリウムの種々の変化及び最終的にリン酸塩緩衝された食塩水に対する種々の変化を含む。

前記した方法によるBPO-D-GL複合体の分析はBPO-D-GLモル比がBPO₄₀-D-GL (2当量のカリウムベンジルベニシリン/当量 γ -NH₂) であることを示した。産生したBPO-D-GL複合体はベンジルベニシロイル又はその誘導体対共重合体のモル比が少なくとも40:1であつた。

BPOに対する高力価IgE、IgG及びIgM抗体反応はBPO-KLHの腹腔内注入により誘発された。第一次免疫化の前又は後の何れかにおいて本発明に従うBPO-D-GLにより後記する如く、かかるマウスの治療は、液索性及び細胞水準の両方で測定したIgE及びIgG種のその後における抗-BPO抗体反応の顕著な抑制をも

特開昭53-121943(9)

KLHを使用してラジオイムノアッセイにより決定した。

下記実施例により本発明の複合体の製造を説明する。

実施例 1

BPO-D-GL複合体

約50,000の平均分子量及びグルタミン酸：リジン残基モル比60:40を有するD-GL共重合体の1g分量を0.1 M炭酸ナトリウム溶液 (pH=11.5) 中に溶解した。pHを1 NaOHの添加により約10-12に維持した。2-8モル当量のカリウムベンジルベニシロイルを加え、そして反応混合物を約10-80℃の温度に約1時間保持した。

得られるBPO-D-GL複合体を透析精製により未反応ベニシリン塩から分離した。この透析は1%ジエチルアミノエチルセルロース (DEA

- 82 -

たらした。

BPO-D-GL処理が第一次免疫化に先行する場合にBPO-D-GLによるBPO-特異性耐性の誘発

液索性免疫反応の分析

二つの群の正常なBALB/cマウスを4投与量の食塩水又は500 μ gのBPO-D-GLにより8日間隔で皮下に注入した。この治療法は、(1)皮下経路の方がD-GL複合体による耐性誘発に対しては腹腔内よりと同じ程又はそれより良好であること及び(2)2回のBPO-D-GLの500 μ g投与量が顕著ではあるが不完全な程度の耐性をもたらすことを証明した予備実験をベースとして選ばれた。最後の投与後1週間目に、動物はみょうばん4ccと混合した感作性抗原BPO-KLH 1 μ gで第一次の免疫を行ない、免疫工程はかかるマウス中における良好なIgE、IgM及び

IgG 第一次抗 - *BPO* 抗体反応を誘発することが見出された。すべての動物を1週間間隔で出血させそしてそれらの血清の抗 - *BPO* 及び抗 - *KLH* 抗体の分析を行なつた。第一次免疫後28日目に、両群のマウスはみょうばん2mgと混合した1μgの*BPO-KLH*で第二次挑戦が行なわれた。7日後それらは出血せしめ、そして殺した。工程成績表及び血清抗体反応のデータを表1に要約した。対照動物は14日まで良好な第一次*IgE* 抗 - *BPO* 抗体反応を発現せしめ、それは21日までにピークに達した。これらの動物は28日目の第二次挑戦に続いて85日目に鋭い既往症反応を示した。対照的に、*BPO-D-GL* で予備処理したマウスは28日の第一次経過にわたつて検出可能な*IgE* 抗 - *BPO* 反応を生ぜずそして第二次挑戦に続いてほんの近い量の抗体を産生したにすぎない。処理したマウスと対照マウス

- 85 -

異種變子皮下アナフィラキシス反応

(heterologous adoptive cutaneous anaphylaxis reactions) を *J. Immunol.* 111, 688-640頁 (1978) に記載の如くして行なつた。データは*IgG* 及び*IgM* 種の実質的により値かな*BPO* - 特異性抗体が未処理対照マウスと比例して*BPO-D-GL* で処理したマウスの脾細胞中に存在していることを示した。



- 87 -

ス間の*IgE* 抗 - *KLH* 抗体力価を85日観察期間にわたる比較は耐性特異性を示した。

J. Immunol. 111, 688-640頁 (1978) に記載のヒツジ赤血球にカップリングした*BPO* を使用して受動血球凝集反応 (passive hemagglutination) により血清*BPO* - 特異性*IgM* 及び*IgG* 抗体を決定した。*IgG* 及び*IgM* 種の抗 - *BPO* 抗体反応は前記した*IgE* 種の結果に類似していた。*BPO-D-GL* で処理したマウスは全免疫期間及びその後の第二次挑戦の期間にわたつて対照に比較して顯著に低い水準の*IgG* 抗 - *BPO* 血清抗体を示した。

脾細胞 (spleen cells) を無菌条件下に除去し、そして *Science* 140, 405-411頁 (1968) に記載の方法によつて*BPO* - 特異性血小板形成性細胞に対して分析した。

- 86 -

表 1

血清抗体反応

BPO-KLH に対する *BALB/c* マウスの第一次*IgE* 抗 - *BPO* 抗体反応に対する *BPO-D-GL* 予備処理の効果

工 程 成 績		血清抗 - <i>BPO</i> 抗体	
群	予備処理	プライミング後の日数	<i>IgE</i>
I	(対照)	7	<10
		14	160
		21	820
		28	820
		85	2560
II	<i>BPO-D-GL</i> s.c. (500μg×4)	7	<10
		14	<10
		21	<10
		28	<10
		85	40

- 88 -

第二次挑戦は28日目に投与した。

先に免疫されたマウスにおけるBPO-D-GL
の投与によるBPO-特異的耐性の誘発

8つの群のBALB/cマウスを、みょうばん4mgと混合したBPO-KLH1μgにより腹腔内にて免疫した2週間後、この群を出血せしめ、次いで食塩水、500μgのBPO-D-GL腹腔内又は500μgのBPO-D-GL s.c.にて隔日にて2回(14日及び16日に)処理した。18日目に、すべての動物をみょうばん2mgと混合したBPO-KLH1μgで第二次挑戦し、そしてその後の8週間にわたり7日間隔で出血させた。第二次免疫後21日目に、動物を殺しそしてそれらの脾細胞をBPO-特異的斑(plaque)形成性細胞に対して分析した。

血清抗体反応の工程成績及びデータを表Ⅱに要約する。8つの群のマウスはすべてBPO-D-

- 89 -

抗-BPO反応において実質的に抑制された。

表 Ⅱ

BPO-KLHに対するBALB/cマウスの第三次IgE抗-BPO及び抗-KLH抗体反応に対するBPO-D-GLによる間隔的に行なう処理の効果

工 程 成 績		血清抗-BPO抗体 (PCA力価)
群	間隔を置いた 処理 第二次挑戦 後の日数	
I (対照) 食塩水	-4	820
	7	1280
	14	1280
	21	800
II BPO-D-GL 腹腔内 (500μg×2)	-4	820
	7	40
	14	40
	21	40
III BPO-D-GL s.c. (500μg×2)	-4	820
	7	40
	14	20
	21	<10

特開昭53-121943(11)

GL処理のすぐ前に比較し得る水準のIgE抗-

BPO抗体を示した。BPO-KLHによる第二次挑戦に続いて、未処理対照マウスは7日及び14日は高原状で挑戦後21日までいくらか傾斜した既往症のIgE反応を示した。対照的に、BPO-D-GLで処理された2つの群はBPO-KLHによる第二次免疫に反応せずそして更に循環しているIgE抗-BPO抗体水準の減少を示し、これは皮下にてBPO-D-GLで処理した群において最も顕著であり；後者の群のIgE力価は21日目に何も検出できなくなるまで漸進的に減退した。21日間の観察期間にわたり処理マウスと対照マウスとの間の比較し得るIgE抗-KLH抗体力価は耐性特異性を示した。

IgG種の抗-BPO抗体反応における同様な発見が得られた。かくしてBPO-D-GLにより処理したマウスは対照と比較してそれらのIgG

- 40 -

脾細胞試験は処理されたマウスの脾中のIgG及びIgM種のBPO-特異的抗体の水準が未処理対照の脾におけるよりも低いことを示した。

上記のことから、本発明は特異的抗原に対する免疫学的耐性の状態が適当な抗原-D-GL複合体の投与により個体中に誘起され得る方法を与える。耐性はIgE並びにIgG及びIgM抗体種において示される。更に、試験結果は耐性が処理期間に動物の免疫状態にかかわりなく確立され得ることを示す。

実 施 例 Ⅱ

BPO-D-GL複合体

平均分子量約64,000及びグルタミン酸：リジン残基モル比60：40を有するD-GL共重合体1g分量及びカリウムベンジルペニシロイル0.5g分量を0.1M炭酸ナトリウム溶液中に溶解した。pHを1N NaOHの添加により10-12

間に保持した。反応混合物を約80℃の温度で約1 1/2時間維持した。

得られるBPO-D-GL複合体を1%DEAEセルロースを含有する0.1M NaHCO₃に対して透析による未反応ベニシリン塩から分離した。透析は約1週間の期間進行せしめられた。

前記した方法により得られたBPO-GL複合体の分析はBPO:D-GLモル比がBPO₃:D-GLであることを示した。

実施例 III

インシュリン-D-GL複合体

豚インシュリン50mg分量を3.1のpHで0.01Mエチレンジアミンテトラ酢酸(EDTA)中に溶解した。溶解したインシュリンを同じEDTA溶液に対して一夜透析した。透析媒体は2.5×10⁻³M EDTAを含有する約9.5のpHの0.088Mホウ酸塩緩衝液に変えた。トルエン-

- 48 -

2.5×10⁻³M EDTAを含有する0.1M (NH₄)₂CO₃に対して透析し、そして溶出剤として2.5×10⁻³M EDTAを含有する0.01M NH₄HCO₃を使用してセファデックス(Sephadex) 675カラム上で分画した。複合体を蒸留水に対して更に透析しそして凍結乾燥した。

実施例 IV

ヌクレオチド-D-GL複合体

こうし胸腺(Calf thymus) DNAのデオキシリボヌクレアーゼ(DNase) Iによる消化、それに続くDEAE Sephadex A25カラム上での分画によりオリゴデオキシヌクレオチド(三量体及び/又は四量体)を製造した。この処理は、5mM トリス(ヒドロキシメチル)アミノメタン(「TRIS」)-7M 尿素緩衝液(pH=7.6)中の0.4M LiCl線状勾配を使用することを含んだ。溶出剤として蒸留水を使用してクロマトグ

特開昭53-121943(12)

2,4-ジイソシアネート(TDIC)を0℃のインシュリン溶液に加えた。反応混合物を約80分間0℃にて激しく攪拌し、次いで約2~4℃の温度で10分間12000gにて遠心分離した。上澄液を栓をした試験管中にデカントし、そして試験管を氷浴中に入れた。反応を氷浴温度に更に1時間進行せしめた。

平均分子量64,000及びグルタミン酸:リジンモル比60:40を有するD-GL共重合体50mg分量を2.5×10⁻³M EDTAを含有する0.088M ホウ酸塩緩衝液(pH 9.5)中に溶解した。pHを2N NaOHより約10-12に調節した。

D-GL溶液をインシュリン溶液に加えた。反応混合物に加えられたインシュリン対D-GLのモル比は10:1であつた。反応を約85~40℃で1時間進行せしめた。次いで反応混合物を

- 44 -

ラフィー法により、尿素を生成したオリゴデオキシヌクレオチドから除去した。

生成したオリゴデオキシヌクレオチドを、約64,000の平均分子量及びグルタミン酸:リジンモル比60:40を有するD-GL共重合体と反応させる。反応はカップリング剤として1-エチル-8-ジイソプロピルアミノカルボジイミド塩酸塩(EDC)を使用して蒸留水中で行なう。

得られる複合体を2~4℃で約1週間の透析により不純物及び未反応出発物質から分離する[J. of Immun., 96, 878 (1966)]。こうし胸腺DNAをデオキシリボヌクレアーゼIにより消化し、それに続いて該原料を約10,000の分子量カット-オフを有する濾過器中を通過せしめることによりオリゴヌクレオチドもまた製造された。好適濾過器はロームアンドハース社(Rohm and Haas Co., Independence Mall

West Philadelphia, Pennsylvania, 19105)

の部門、アミコン (Amicon) から商標名 PM-10 の下に入手できる。溶液をオリゴデオキシヌクレオチドのリースとして使用した。

ヌクレオチドは複素環式塩基、五炭糖及びホスフェートから成る。核酸は、ホスホーリエステル結合により相互に結合した4の異なるヌクレオチドから成る。オリゴヌクレオチドはホスホーリエステル結合により相互に結合している10より少ないヌクレオチドから成る。このリエステル結合はヌクレオチドを比較的複雑な化学物質ならしめる。核酸に対して特異的抗体は塩基及び／又は糖のみならずこれらのヌクレオチドを含有するホスフェートバックボーンに対しても特異的である。故に、非免疫原性担体 (たとえば D-G L) に結合した少さいオリゴヌクレオチドを使用することによつて、自己免疫疾患の病理学的状態に直接関

- 47 -

により 7.5 - 8.0 に上昇せしめた。

Worthington Biochemicals, Inc.,

Freshford, New Jersey, 07728 から入手できるサワギク抗原 E の 5 ㎖分量を蒸留水中に溶解し、D-G L-ウッドワーズ試薬溶液に加えた。抗原 E は 87,800 の分子量を有し、窒素は 17.1 % であり、炭水化物は 0.2 % であつた。S 値は 3.05 であり、1 cm における 1 % 溶液の吸光係数 (280 mμ) は 1.18 であつた。

混合物を 6℃ で 24 時間撹拌した。反応混合物を溶出剤として 0.1 M NH_4HCO_3 を含めて、0.01 M NH_4HCO_3 を使用してセファデックス G-100 カラム上で分画した。第一ピークを含む管を相互にブールし、そして複合体を更に蒸留水に対して透析しそして凍結乾燥した。

本発明は、いかなる抗体機能障害に関しても病理学的発現の治療に対して治療学的意義を有する。

- 48 -

特開昭53-121943(13)

連した核酸環境が得られる。対照的に、ホスホーリエステル結合を含まないヌクレオチドに対する耐性の先行技術による誘発はハプテン-D-G L 耐性、たとえば、Dnp-D-G L により密接に関連している。オリゴデオキシヌクレオチドに対する耐性の誘発は核酸に対する耐性の誘発に等しいと考えることができる。

実施例 V

サワギク抗原 E-D-G L 複合体

64,000 の平均分子量及びグルタミン酸：リジンモル比 60 : 40 を有する D-G L 共重合体 50 ㎖分量を蒸留水 2 M 中に溶解した。溶液を氷浴中で 0℃ に冷却しそして撹拌した。N-エチル-5-フェニルイソキサゾリウム 8'-スルホネート (Woodward's Reagent) 50 ㎖分量を蒸留水 0.5 M 中に溶解し、D-G L 溶液に加えて、撹拌を 0℃ で約 1 時間続行した。pH を 2 N NaOH

- 48 -

先に示した如く、多数の個体が環境的抗原に対して過敏症であるので、これらのアレルギー症状を軽減するべき治療方法は大きな治療学的価値がある。本発明により、特異的な感受性抗原に対答する IgE 及び IgG 抗体産生は大巾に抑制される。

従つて、本発明の抗原-D-G L 複合体及び治療は、アレルゲンとして表示される広い範囲の環境的抗原を含む。たとえば、代表的アレルゲンはペニシリンの如き医薬；インシュリンの如きホルモン；サワギク、ベルムダー草、果樹園草及びアモニー草の如き花粉、クリサンテムムロイカンテムムの如き花の花粉及び樟の木の如き樹木花粉；すずめ蜂 (bee wasp) 及び蛇の毒液；馬蹄屑の如き動物のふけ (danders)；猫土皮の如き動物上皮；ハッドドック、おらんだいちごの如き食品タンパク質アレルゲン、ハウスダストダニ；パン酵母 [麦酒酵母菌 (Saccharomyces cerevisiae)]

- 50 -

の如き菌類；アルテルナリアデメイスの如きカビ類；ジフテリアの如き毒素；破傷風の如きトキソイド；オвалブミンの如きタンパク質；トリブシン、キモトリブシン及びフィチンの如き酵素；及びこれらのアレルゲンの誘導体を包含するがそれ限定するものではない。

過敏症の個体にアレルギー症状を生ぜしめる前記した環境的アレルゲンに加えて、本発明は自己免疫疾患の治療に対して治療学的価値を有する。自己免疫疾患は個体の体の殆んどすべての部分に影響を及ぼすことができる。いくつかの反応は器官-特異性抗体を志向し、そして特定の細胞種類たとえば悪性貧血 (pernicious anemia) における胃粘膜の壁細胞に向けることができる。他の反応は広く分布した抗原に向けられ、そして伝染性疾患、たとえば全身系紅斑性狼瘡 (systemic lupus erythematosus) (SLE) に関連して

いる。更に他の疾病においては反応はこれらの基礎の中間、たとえば慢性の糸球体腎炎 (glomerulonephritis) 及び肺出血 (pulmonary hemorrhages) により特徴づけられたグッドパスチュア病 (Goodpasture's disease) であり、抗体は腎糸球体 (Kidney glomeruli) 及び肺実質 (lung parenchyma) の基礎膜に付着している。

抗体は、アセチルコリン受容体部位に対する抗体が神経インパルスの伝達を阻害する筋無力症 (myasthenia gravis) において生じる如く、特異的細胞受容体に対しても産生される。抗体はインシュリン受容体部位に対して形成されることができて細胞に対するインシュリンの結合を阻止し (blocking)；それによりホルモンの正常な作用を妨害する。

- 5 1 -

- 5 2 -

代表的な自己免疫疾病及び対応抗原は、

甲状腺	ハシモチの甲状腺炎 (Hashimoto's thyroiditis) (hypothyroidism)	チログロブリン 及び
	甲状腺中毒症 (Thyrotoxicosis) (hyperthyroidism)	甲状腺細胞表面
胃の因子(II)粘膜	悪性貧血 (ビタミン12不足)	固有の頭頂細胞
副腎	アジソン病 (Addison's disease)	副腎細胞
皮膚	尋常性天疱瘡 (Pemphigus vulgaris) (Pemphigoid)	表面細胞 (Epidermal cells) 及び 表皮-真皮間の基礎膜
目	交感性眼炎 (Sympathetic ophthalmia)	葡萄膜
赤色細胞	自己免疫性溶血性貧血 (autoimmune hemolytic anemia)	赤色細胞表面

小 板	自然発生の血小板減少性貧血 (<i>Idiopathic thrombocyto- penia purpura</i>)	小 板 表 面
骨 格 筋 及 び	筋無力症	筋 肉 細 胞
心 筋	(<i>Myasthenia gravis</i>)	及 び 胸 腺 筋 様 部 細 胞
肝 臓 (胆 道)	第一次胆汁性肝硬変 (<i>primary biliary cirrho- sis</i>)	ミ ト コ ン ド リ ア (主 として)
唾 液 腺 及 び 涙 腺	シ ョ ー グ レ ン 病 (<i>Sjögren's disease</i>)	分 泌 管、ミ ト コ ン ド リ ア 核 及 び <i>IgG</i> を 含 む
滑 液 膜 他	リウマチ様関節炎 (<i>Rheumatoid arthritis</i>)	<i>IgG</i> の <i>Fc</i> 領域

- 5 4 -

本発明の方法によれば、自己免疫疾病の軽減は前記した種々の自己免疫疾病において包含された適当な抗原をD-GLにカップリングさせることにより達成され得ることは明らかである。自己抗原に対するIgG抗体の産生の抑制は治験学的に価値がある。

特許出願人 デビッド・ハーベイ・カツツ

代 理 人 弁理士 小田 島 平 吉

